

液基薄层细胞制片技术联合细胞 DNA 定量分析对良恶性胸腹水患者的诊断价值*

李楣, 张丽丽**, 姚蓓, 夏静, 余文静, 肖娟, 候秋萍

(重庆市第十三人民医院 检验科, 重庆 400053)

[摘要] 目的: 探究液基薄层细胞制片技术联合细胞 DNA 定量分析对良恶性胸腹水患者的诊断价值。方法: 收集 97 例疑似肿瘤患者的胸腹水标本, 以组织病理学诊断为标准, 采用液基薄层细胞制片技术检查胸腹水中可疑癌细胞或癌细胞, 采用福尔根染色法对胸腹水细胞 DNA 进行定量、计算 DNA 指数(DI)及 DNA 含量, 分析上述 2 种方法单独检测及联合检测对良恶性病变的诊断符合率、灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值。结果: 液基薄层细胞制片、细胞 DNA 定量分析分别与组织病理学诊断阳性率相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 2 种方法联合检测的诊断符合率、诊断灵敏度和阴性预测值均分别高于液基薄层细胞制片和细胞 DNA 定量分析($P < 0.05$)。结论: 液基薄层细胞制片技术联合细胞 DNA 定量分析胸腹水良恶性性质具有较高的诊断符合率、灵敏度和阴性预测值。

[关键词] 肿瘤; 胸水; 腹水; 诊断; 液基薄层细胞制片; DNA 定量分析

[中图分类号] R361⁺³ **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-8388(2020)05-0616-05

DOI: 10.19367/j.cnki.2096-8388.2020.05.021

Diagnostic Value of Liquid Based Thin Layer Cell Sectioning Technique Combined with Quantitative Analysis of Cellular DNA in Pleural and Abdominal Ascites Derived from Patients with Benign and Malignant

LI Mei, ZHANG Lili, YAO Bei, XIA Jing, YU Wenjing, XIAO Juan, HOU Qiuping

(Department of Clinical Laboratory, the Thirteenth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400053, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the diagnostic value of liquid-based thin layer cell sectioning technology combined with quantitative analysis of cellular DNA in patients with benign and malignant pleural and ascites. **Methods:** We collected the pleural and abdominal ascites specimens from 97 patients with suspected tumors based on histopathological diagnosis. Liquid-based thin-layer cell preparation technique was used to examine suspicious cancer cells or cancer cells in the pleural and ascites. DNA was quantified in cells in the pleural and ascites using Forgen staining. DNA index (DI) and DNA content were calculated. We compared the effect of the above two methods alone and their combination on diagnostic accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive values and negative predictive values of detecting benign and malignant lesions. **Results:** Both liquid-based thin-layer cell preparation and quantitative analysis of cellular DNA were statistically different from the positive rate of histopathological diagnosis ($P < 0.05$). The diagnostic coincidence rate, diagnostic sensitivity and the negative predictive values were higher in combination of two methods than those in liquid-based thin layer cell preparation or quantitative analysis of cellular DNA ($P < 0.05$). **Conclusion:** Liquid-based thin-layer cell preparation technology combined with quantitative analysis of cell DNA for benign and

*[基金项目] 重庆市科卫联合医学科研项目(2018MSXM120)

**通信作者 E-mail: 44755977@qq.com

malignant properties of pleural and ascites fluid has a high diagnostic coincidence rate, sensitivity and negative predictive value.

[**Key words**] neoplasms; hydrothorax; ascites; diagnosis; liquid-based thin layer cell sectioning; DNA quantitative analysis

肿瘤包含恶性肿瘤与良性肿瘤,胸腹水是肿瘤患者主要的临床症状,一旦发现应及时就医,以免延误最佳治疗时间^[1-3]。临床上胸腹水可分为良性胸腹水和恶性胸腹水,不同原因导致的胸腹水的性质、治疗和预后截然不同,因此快速而准确地诊断其良恶性对原发病的治疗和预后均有重要意义^[4-5]。液基薄层细胞制片技术的制片流程简便、特异性高,但敏感性低、需要经验丰富的医生参与阅片诊断,难以用于肿瘤的早期筛查^[6-7]。现代研究表明,细胞脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)定量分析是建立在基因水平的、对细胞内 DNA 含量进行快速测量并自动分析的新技术,可用于胸腹水中细胞 DNA 的定量分析,但该方法容易受致病菌感染等因素的影响,出现 DNA 异倍体现象,特异性不高^[8]。目前关于将液基薄层细胞制片技术联合细胞 DNA 定量分析进行胸腹水良恶性诊断的文献报道较少,且未有定论,因此本研究旨在探讨液基薄层细胞制片技术联合细胞 DNA 定量分析对良恶性胸腹水的诊断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料、主要试剂与仪器

1.1.1 资料 收集 2018 年 11 月-2019 年 8 月收治的疑似肿瘤患者的临床资料,且所有患者以组织病理学结果为金标准鉴别良恶性胸腹水,要求有肿瘤的组织病理学诊断依据(包括肺癌、乳腺癌和淋巴瘤等疾病)、首次接受液基薄层细胞制片及细胞 DNA 定量分析者、未接受肿瘤治疗者、年龄 ≥ 50 岁,排除肝肾等重要脏器功能不全者、有血液系统疾病者、意识障碍者及临床资料不全者等。最终纳入疑似肿瘤患者 97 例,男性 56 例、女性 41 例,年龄 50~71 岁、平均 (54.12 ± 2.34) 岁,体质指数(body mass index, BMI)为 (16.78 ± 1.23) kg/m²,胸水 55 例、腹水 42 例,组织病理学诊断恶性肿瘤 58 例、良性肿瘤 39 例。

1.1.2 主要试剂与仪器 巴氏染液试剂(湖北孝感德立森),硫堇染色液(武汉兰丁医学);DCT-06

液基超薄细胞制片仪(湖北孝感德立森),LD DNA-ICMII 细胞 DNA 定量检测分析仪(武汉兰丁医学)。

1.2 方法

1.2.1 液基薄层细胞制片 收集患者胸腹水标本 100 mL, 3 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,留取沉淀物检查;吸取沉淀加入到保存液中,上机制作液基薄层细胞涂片,固定、巴氏染色,400 倍显微镜下阅片见可疑癌细胞或癌细胞为阳性^[8]。

1.2.2 细胞 DNA 定量检测与判断 收集患者 100 mL 胸腹水标本,方法同 1.2.1,制作涂片,采用福尔根染色法对细胞核染色测量 DNA 含量(福尔根染色中的细胞核着色深浅度与 DNA 含量成正比);通过光学自动三维移动平台对福尔根染色的细胞核进行自动扫描,测定细胞核的积分光密度值(integrated optical density, IOD)及核面积等 99 个参数,计算 DNA 指数(DNA index, DI)或 DNA 含量(c)大小判断细胞的异常情况,规定 $DI = 1 \sim 2$ 或 $DNA \text{ 含量} = 2 \sim 4 c$ 为正常细胞, $DI = 2 \sim 2.5$ 或 $DNA \text{ 含量} = 4 \sim 5 c$ 为细胞增殖期, $DI > 2.5$ 或 $DNA \text{ 含量} > 5 c$ 为异常细胞,判定为阳性^[9]。

1.2.3 联合检测 液基薄层细胞制片见可疑癌细胞或癌细胞,且 $DI > 2.5$ 或细胞 DNA 含量 $> 5 c$ 为异常细胞,判定为阳性^[9]。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。以 n (%)表示计数资料,与组织病理学诊断结果的一致率比较使用配对 χ^2 检验,计算各检测方法对良恶性胸腹水鉴别诊断中的准确率、灵敏度、特异性、阴性及阳性预测值,其中诊断的准确率与灵敏度比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同检查方法与组织病理学诊断结果的比较

液基薄层细胞制片检测可见典型的肿瘤细胞团,乳头样或腺样结构,细胞排列紊乱,细胞核增大,核仁明显,染色质粗,核膜不规则,诊断为可见癌细胞(图 1);细胞 DNA 定量分析可见大量异倍

体细胞及异倍体细胞峰出现(图2);不同检查方法与组织病理学诊断结果比较显示,液基薄层细胞制片、细胞DNA定量分析分别与组织病理学诊断阳性率相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但联合检测与组织病理学诊断阳性率相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 不同检查方法的符合率

联合检测诊断符合率分别高于液基薄层细胞制片和细胞DNA定量分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但液基薄层细胞制片与细胞DNA定量分析诊断符合率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

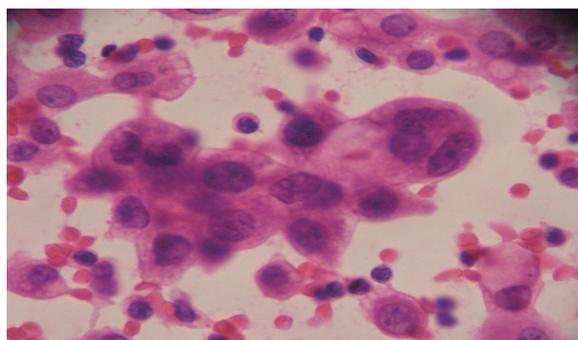
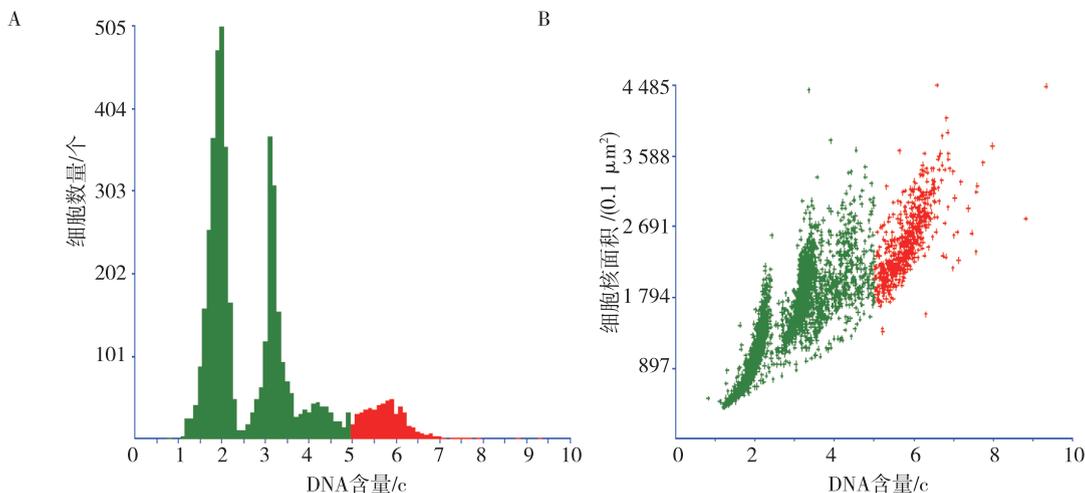


图1 典型病例右侧胸腔积液标本液基薄层细胞制片(400×)

Fig.1 A thin layer cell section of the right pleural effusion specimen of a typical case (400×)



注:A为细胞数量,仪器扫描可见大量异倍体细胞及异倍体细胞峰(标本号:D191360;被测细胞:4 855;参考细胞:0; >5 c 细胞:551;细胞总数:4 855;二倍体细胞:984;被测细胞比例:100%;均值:1;标准差:0.029;变异系数:1.444);B为细胞核面积,仪器扫描可见细胞核面积增大;DNA含量<5 c为正常。

图2 典型病例右侧胸腔积液标本的细胞DNA定量分析

Fig.2 DNA quantitative analysis of right pleural effusion specimen in a typical case

表1 不同检查方法良恶性肿瘤检出结果与组织病理学诊断结果比较[n(%)]

Tab.1 Comparison of benign and malignant tumor detection results and histopathological diagnosis results by different examination methods[n(%)]

检查方法	结果	组织病理学诊断		χ^2	P
		阳性	阴性		
液基薄层细胞制片	阳性	39(40.21)	3(3.09)	11.634	0.001
	阴性	19(19.59)	36(37.11)		
细胞DNA定量分析	阳性	46(47.42)	4(4.12)	4.000	0.045
	阴性	12(12.37)	35(36.08)		
联合检测	阳性	55(56.70)	4(4.12)	0.143	0.705
	阴性	3(3.09)	35(36.08)		

表2 不同检查方法良恶性肿瘤诊断符合率的比较[n(%)]

Tab.2 Comparison of diagnostic accuracy of different examination methods for benign and malignant tumors[n(%)]

检查方法	符合	不符合
液基薄层细胞制片	75(77.32)	22(22.68)
细胞DNA定量分析	81(83.51)	16(16.49)
联合检测	90(92.78) ⁽¹⁾⁽²⁾	7(7.22)

注:⁽¹⁾与液基薄层细胞制片比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与细胞DNA定量分析比较, $P < 0.05$ 。

2.3 诊断价值

联合检测诊断良恶性积液的灵敏度分别高于液基薄层细胞制片和细胞 DNA 定量分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);液基薄层细胞制片、细胞 DNA 定量分析及联合检测间的特异性差异无统计学意义($P > 0.05$);联合检测诊断的阴性预测值分别高于液基薄层细胞制片和细胞 DNA 定量分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);液基薄层细胞制片、细胞 DNA 定量分析及联合检测间的阳性预测值差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 不同检查方法的诊断价值
Tab. 3 Diagnostic values of different examination methods

组别	诊断价值/%			
	灵敏度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
液基薄层细胞制片	67.24	92.31	92.86	65.45
细胞 DNA 定量分析	79.31	89.74	92.00	74.47
联合检测	94.83 ⁽¹⁾⁽²⁾	89.74	93.22	92.11 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:⁽¹⁾与液基薄层细胞制片比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与细胞 DNA 定量分析比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

正常情况下,胸腔内存在少量液体起到润滑作用,减少呼吸活动过程中胸膜间摩擦,维持心肺功能正常运转,一旦胸腹腔出现恶性肿瘤细胞浸润或炎症反应,便可导致胸腹腔积液,其性质也随之变化^[10-12]。大部分肿瘤转移患者存在不同程度胸腹水,因此更早地发现癌前病变细胞,进行预防和相关临床处理,快速鉴别胸腹水的良恶性在临床中有重要意义^[13]。

近年来,液基薄层细胞制片技术逐步用于胸腹水、尿液及痰液标本等非妇科领域脱落细胞学检查^[14]。本研究结果表明,以组织病理学诊断结果为金标准,液基薄层细胞制片技术特异性较高,其与组织病理学诊断结果差异有统计学意义($P < 0.05$),但其诊断良恶性肿瘤的灵敏度不高,这可能是由于液基薄层细胞制片技术通过对制片方式和流程的改善,优化了制片效果,提高了阳性检测率,一定程度上对传统细胞学中的部分缺点进行了弥补^[15-16]。但该法主要是形态学定性诊断,采集的胸腹水中细胞数量水平较低,部分细胞形态较为相似,这些原因对疾病的鉴别判断带来了一定的影响,难以独立实现对癌症早期阶段的有效筛查^[17]。

因此液基薄层细胞制片技术仍然存在争议,本研究结果也和 Inage 等^[18]研究结果类似。

细胞 DNA 定量分析技术具有对流动状态下的细胞进行快速、大量及多参数分析的特点,临床价值及准确度较高^[19]。正常人体细胞的 DNA 含量较为恒定,为 2 倍体细胞;当细胞进入分裂期时,细胞 DNA 含量增加甚至倍增,形成 4 倍体细胞^[20]。在细胞癌变时,染色体的结构和数目均会发生异常,出现 DNA 异倍体,DNA 异倍体细胞的出现是判断恶性肿瘤细胞的标志之一^[21-23]。本研究通过对样本细胞核内 DNA 的含量或染色体倍体的测定来判断细胞的生理状态和病理改变,结果显示,以组织病理学诊断结果为金标准,细胞 DNA 定量分析与组织病理学诊断结果有统计学意义($P < 0.05$),其诊断符合率及灵敏度处于居中位置,均高于液基薄层细胞制片,但低于联合检测方法,这可能是由于患者的胸腹水中存在分裂时期的病变细胞,即异倍体,且在细胞恶变过程中细胞 DNA 含量早于细胞形态发生改变,但细胞 DNA 定量分析系统仅能判断 DNA 倍体已经发生变化的肿瘤细胞,对未发生改变的肿瘤细胞不能测定。这也与 Bisht 等^[24]研究结果相符。此外,联合检测诊断的阴性预测值分别高于液基薄层细胞制片和细胞 DNA 定量分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);但液基薄层细胞制片与细胞 DNA 定量分析诊断符合率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果表明,液基薄层细胞制片检查是医师根据细胞形态学的改变所做的判断,主观性较强、易漏诊,特异性较高^[25-26];细胞 DNA 定量方法灵敏度较液基薄层细胞制片方法高且更为客观,但特异性较低^[27]。联合检测可提高恶性胸腹水的诊断阳性率,特别是对液基薄层细胞诊断不明确,无法判定良恶性时,细胞 DNA 定量分析辅助判断细胞良恶性,提高诊断阳性率,降低漏诊和误诊发生率^[28-29]。因此,液基薄层细胞制片和细胞 DNA 定量分析具有较好的互补性,联合使用较单项检查灵敏度均有提高,可以克服单项检查固有的一些缺陷,具有较高的临床应用价值,有利于患者疾病的治疗,提高治疗有效率,在临床诊断中应大力推广应用^[30]。

综上,液基薄层细胞制片技术联合细胞 DNA 定量分析胸腹水良恶性性质具有较高的诊断符合率、灵敏度和阴性预测值,在良恶性胸腹水患者的诊断中具有较高的应用价值,定性和定量相结合,优势互补,值得推广应用。

4 参考文献

- [1] 陈越,郑军,谭潇. 光动力疗法在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 实用医学杂志,2019,35(16):2517-2521.
- [2] 王维飞,蒋宗惠,董祥宁,等. 胃癌患者腹腔热灌注联合静脉化疗治疗恶性腹水的临床研究[J]. 海军医学杂志,2018,39(2):188-190.
- [3] ALOREIDI K,GEDELA M,WABWIRE G, et al. Refractory hepatic hydrothorax in the absence of ascites as a first sign of cirrhosis[J]. South Dakota Journal of Medicine, 2018,71(4):168-170.
- [4] 李曼,石兴民,郭睿,等. 胸腹水中肿瘤相关巨噬细胞不同活化亚型的分析[J]. 国外医学(医学地理分册), 2019,40(2):120-123.
- [5] ZHU F L,LING A S,WEI Q, et al. Tumor markers in serum and ascites in the diagnosis of benign and malignant ascites[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2015,16(2):719-722.
- [6] 李新玲. HC2-HPV DNA 联合 TCT 检测早期诊断宫颈癌的价值[J]. 医学新知杂志,2018,28(3):258-259.
- [7] ZHANG H,DU G,LIU Y F, et al. Overlay of a sponge soaked with ropivacaine and multisite infiltration analgesia result in faster recovery after laparoscopic hepatectomy [J]. World Journal of Gastroenterology, 2019,25(34):5185-5196.
- [8] 谢小林,刘家斌,张利. 液基细胞学检查在恶性胸腹水鉴别诊断中的临床应用[J]. 当代医学,2018,24(29):36-39.
- [9] 汪少华,李丹,黄丛改,等. 薄层液基细胞学联合 DNA 定量分析检测在肺癌中的诊断价值[J]. 临床与实验病理学杂志,2019,35(7):832-834.
- [10] 李玲义,张琪,姚文静,等. 成人复杂性肺炎旁胸腔积液的治疗研究进展[J]. 华南国防医学杂志,2018,32(5):351-354.
- [11] 吴伟东,刘清峰,姜锋,等. 基质金属蛋白酶在胸腔积液形成中作用的研究进展[J]. 山东医药,2019,59(16):100-103.
- [12] 刁彦文,董召,曲秀娟,等. 腔内灌注贝伐单抗治疗恶性胸腹腔积液的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2019,27(8):1441-1444.
- [13] 郭金英,张开红,陈莎丽,等. 血清、腹水中甲胎蛋白、癌胚抗原及癌抗原 125 检测对良、恶性腹水的诊断价值[J]. 中国实用医刊,2019,46(10):42-44.
- [14] 李相磊,孔瑞华,杨树利,等. 比较胸腹水常规细胞学和液基细胞学在肿瘤细胞中的研究价值分析[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(6):744-746.
- [15] 许娟. 细胞 DNA 倍体联合肿瘤标志物检测在良恶性胸腔积液、腹水鉴别中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2019,16(23):3469-3471.
- [16] NALWA A,WALIA R,SINGH V, et al. Comparison of conventional smear and liquid-based cytology preparation in diagnosis of lung cancer by bronchial wash and trans-bronchial needle aspiration [J]. Journal of Cytology, 2018,35(2):94-98.
- [17] 李维前,高立永,季洪菊等. 两种膜式液基薄层细胞制片仪的应用对比研究[J]. 中国医疗设备,2018,33(6):92-94.
- [18] INAGE T,NAKAJIMA T,YOSHINO I, et al. Early lung cancer detection[J]. Clinics in Chest Medicine,2018,39(1):45-55.
- [19] 赵雪,杜广,李东等. DNA 倍体分析系统在输尿管癌筛查及诊断中的应用[J]. 临床和实验医学杂志,2019,18(11):1215-1217.
- [20] 余晓川,毛怀凤,王婷等. 300 例藏族慢性乙肝患者血清标本乙肝病毒 DNA 定量与免疫学标志物检测的对比分析[J]. 标记免疫分析与临床,2019,26(8):1334-1337.
- [21] 张久荣,邹珏,林勇. DNA 定量细胞学检查联合液基细胞学检测在胸腔积液鉴别诊断中的应用[J]. 临床肺科杂志,2019,24(4):48-53.
- [22] 张海彪. 进展期胃癌患者手术前后脱落细胞及 DNA 异倍体阳性率分析[J]. 肿瘤学杂志,2018,24(8):838-840.
- [23] 马俊,王丽萍,黄玮,等. 腹水脱落细胞 DNA 倍体对良恶性腹水的诊断价值研究[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版),2018,36(3):69-72.
- [24] BISHT B,HANDA U,MOHAN H, et al. Complementary value of DNA flow cytometry and image morphometry in detection of malignant cells in effusion fluids [J]. The Malaysian Journal of Pathology,2014,36(2):83-90.
- [25] 杨海. 血液细胞形态学检查在血常规检测中的应用价值[J]. 哈尔滨医药,2019,39(1):60-61.
- [26] 周红儿. 子宫上皮细胞稳定性 FH 检测与 TCT 检测在宫颈癌及癌前病变筛查中的诊断价值比较[J]. 中国乡村医药,2019,26(12):54-55.
- [27] 邹萍,胡怀远,宋瑞,等. 液基薄层细胞学检测技术在肺癌诊断中的作用[J]. 安徽医药,2018,22(1):105-108.
- [28] 李攀,董莉萍,张晓波,等. 脱落细胞涂片、DNA 图像倍体分析和细胞块及其联合试验对恶性胸腔积液的诊断价值[J]. 吉林大学学报(医学版),2019,45(3):639-642.
- [29] 蒋楠楠,邱伟东,刘集鸿,等. 外周血异型淋巴细胞检查与 EBV DNA 定量检测在 IM 的早期诊断价值[J]. 浙江临床医学,2018,20(7):1281-1283.
- [30] 李雯,韩莉. TCT 联合 DNA 细胞倍体筛查在宫颈病变诊断中的应用价值[J]. 中国医药指南,2019,17(14):111-112.

(2020-02-19 收稿,2020-05-03 修回)

中文编辑:严征;英文编辑:张启芳